

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)

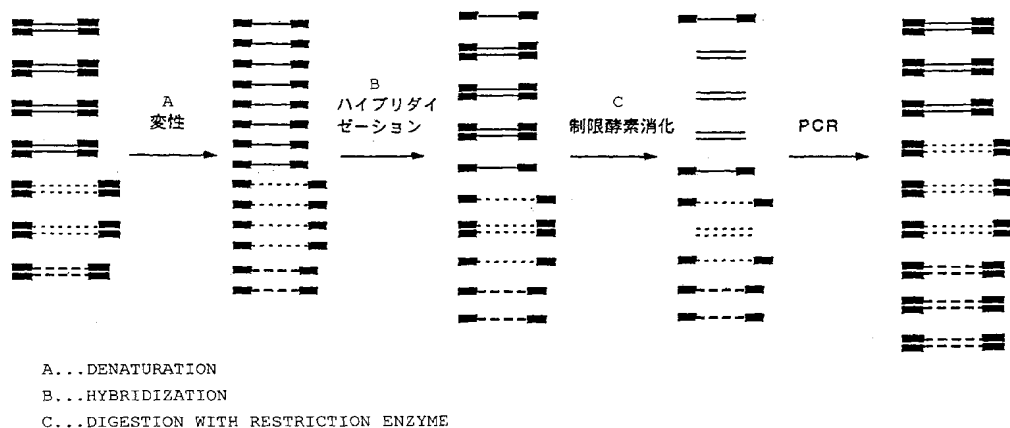
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/103007 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/68 (ONO,Yuichi) [JP/JP]; 〒567-0041 大阪府 茨木市 下穂積 1-2-30 ノーブル山岡 403号 Osaka (JP). 今井俊夫 (IMAI,Toshio) [JP/JP]; 〒602-8482 京都府 京都市 上京区 浄福寺上立売上ル大黒町 688 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/06109
- (22) 国際出願日: 2002 年 6 月 19 日 (19.06.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-184757 2001 年 6 月 19 日 (19.06.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO. LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都 文京区 小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 尾野 雄一
- (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA,Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都 中央区 東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 ヨコヤマビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF UNIFORMIZING DNA FRAGMENT CONTENTS AND SUBTRACTION METHOD

(54) 発明の名称: DNA 断片の量の均一化方法及びサブトラクション法



(57) Abstract: A method of uniformizing DNA fragment contents among DNA fragments contained in a sample which comprises preparing DNA fragments wherein adaptors comprising an oligodeoxyribonucleotide are attached to both ends of DNA fragments in the sample to form restriction enzyme recognition sites not existing in the DNA fragments in the sample and at least the part between the restriction enzyme sites (inclusive) at the both ends is made into double-stranded, denaturing the double-stranded DNA fragments thus prepared, hybridizing the denatured DNA fragments under such conditions that a part of the DNA fragments remain single-stranded, cleaving the hybridized double-stranded DNA fragments with the restriction enzyme having the cleavage site exclusively in the adaptors, and then effecting a PCR using the thus obtained DNA fragments as templates and using primers having base sequences complementary to the base sequences of the adaptors before the cleavage; and a subtraction method involving the step of uniformization by the above-described procedures.

[続葉有]



(57) 要約:

試料中のDNA断片の両端に、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプターが付加されて、試料中のDNA断片に存在しない制限酵素認識部位が形成され、かつ、少なくとも両端の制限酵素認識部位の間が制限酵素認識部位も含めて二本鎖とされたDNA断片を準備し、準備された二本鎖DNA断片を変性させ、変性したDNA断片を、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした二本鎖DNA断片を、アダプター内にのみ切断部位を有する制限酵素により切断し、得られたDNA断片を鋳型とし、切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行うことにより、試料中のDNA断片の量を各DNA断片間で均一化する方法、および、その方法により均一化を行うことを含むサブトラクション法。

明細書

DNA断片の量の均一化方法及びサブトラクション法

技術分野

本発明は、試料中のDNAの量を各DNA間で均一化する方法、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法、細胞間で発現が相違する遺伝子のライブラリーの製造方法、及び、細胞間で発現が相違する遺伝子に特異的なプローブの製造方法に関する。

背景技術

細胞の分化、発生などの生命現象や細胞の癌化などの病態、薬物に対する応答などを理解する上で、遺伝子発現変動の解明は一つのアプローチとして頻繁に用いられている。そのための細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法として、サブトラクション法やディファレンシャルディスプレイ法などが知られている。

サブトラクション法については、従来のサブトラクション法に比べて、より感度が高く、バックグラウンドの低い方法として、PCRを用いたサブトラクション法（レプレゼンテーションディファレンスアナリシス(RDA)法）が開発され、普及しつつある。この方法では複数回のサブトラクションハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、非常に低いバックグラウンドを実現しており、比較的遺伝子発現の差の少ない細胞集団間でのサブトラクションに有用であると考えられている。しかし、問題点として、発現量の多い遺伝子がより濃縮されてしまうために、発現量の少ない遺伝子は単離することが出来ないことが分かってきている。この点を克服する方法として、サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション（SSH）法が開発されている。この方法は、遺伝子の発現量の差をある程度均一化しながらサブトラクションを行う方法で、発現量の少ない遺伝子も単離できるとされている。均一化の方法としては、アダプターを付加したテスターとアダプターを付加しないドライバーとの間での部分的なハイブリダイゼーション

を行い、一本鎖として残ったDNAをサプレッションPCRにより増幅する方法が用いられている。

発明の開示

本発明は、発現量の少ない遺伝子であっても、発現量の相違に基づいて遺伝子を単離することを可能にする新たな均一化の方法を提供することを課題とする。また、本発明は、この方法により均一化を行うことを含む、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法、および、この検出方法により細胞間で発現が相違する遺伝子のライブラリーを製造する方法を提供することを課題とするものである。

本発明者らは、RDA法に均一化のステップを加えることができれば、発現量の少ない遺伝子であっても、発現量の相違に基づいて遺伝子を単離することが可能になると考え、研究した結果、RDA法における反応液中のDNA量を各DNA間で均一化するのに使用できる均一化方法を見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

本発明は、以下のものを提供する。

(1) 試料中のDNA断片の量を各DNA断片間で均一化する方法であって、試料中のDNA断片の両端に、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプターが付加されて、試料中のDNA断片に存在しない制限酵素認識部位が形成され、かつ、少なくとも両端の制限酵素認識部位の間が制限酵素認識部位も含めて二本鎖とされたDNA断片を準備し、

準備された二本鎖DNA断片を変性させ、

変性したDNA断片を、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせ、

ハイブリダイズした二本鎖DNA断片を、アダプター内にのみ切断部位を有する制限酵素により切断し、

得られたDNA断片を鋳型とし、切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う

ことを含む方法。

(2) サブトラクティブハイブリダイゼーションを1回以上行うことを含む、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法であって、少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションの前または後に(1)の方法により均一化を行うことを含む方法。

(3) 少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションが、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片を生じるものであり、そのサブトラクティブハイブリダイゼーションの後に均一化を行う(2)の方法。

(4) サブトラクティブハイブリダイゼーションが2回以上行われ、1回目のストラクティブハイブリダイゼーションが、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片を生じるサブトラクティブハイブリダイゼーションである(3)の方法。

(5) (2)～(4)のいずれか1項に記載の方法により発現の差異が検出された遺伝子をクローニングすることを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子のライブラリーを製造する方法。

(6) (2)～(4)のいずれか1項に記載の方法により発現の差異が検出された遺伝子の断片を調製することを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子に特異的なプローブを製造する方法。

(7) 試料中のDNA断片の両端に付加するための、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプター、アダプター内に切断部位を有する制限酵素、および、その制限酵素による切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するPCR用プライマーを含む、(1)の方法に使用するためのキット。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の均一化の原理の説明図である。

図2は、N-RDA法の精度検証の結果を示す電気泳動写真である。

図3は、N-RDA法の精度検証の結果を示す電気泳動写真である。

図4は、N-RDA法の精度検証の結果を示す電気泳動写真である。VE:さい帯静脈内皮細胞、AE:さい帯動脈内皮細胞、ADM:皮膚毛細血管内皮細胞、TE:扁桃内皮細胞、BME:脳毛細血管内皮細胞、MS1:マウス血管内皮細胞株、Eph4:マウス上皮細胞株。

図5は、N-RDA法で単離したクローンの各種血管内皮細胞での発現の結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法は、試料中のDNA断片の量を各DNA断片間で均一化する方法（以下、「均一化方法」ともいう）であって、

(a) 試料中のDNA断片の両端に、DNA断片にない制限酵素認識部位を形成するオリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプターが付加され、かつ、少なくとも両端の制限酵素認識部位の間が制限酵素認識部位も含めて二本鎖とされたDNA断片を準備し、

(b) 準備された二本鎖DNA断片を変性させ、

(c) 変性したDNA断片を、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせ、

(d) ハイブリダイズした二本鎖DNA断片を、アダプター内にのみ切断部位を有する制限酵素により切断し、

(e) 得られたDNA断片を鋳型とし、切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行うことを特徴とする。

試料としては、DNA断片を含む限り限定されない。DNA断片としては、例えば、細胞から調製したmRNAから合成されるcDNAまたはその断片、サブトラクションハイブリダイゼーションにより得られる、細胞間で発現が相違する遺伝子のDNA断片などが挙げられる。

本発明による均一化の原理を図1を参照して説明する。二本鎖cDNAを変性させてから、再びハイブリダイズ（アニーリング）させると、量の多いものから順に二本鎖形成していき、少ないものは二本鎖になりにくい。したがって、ある程度反応の進んだ時点で、一本鎖のままで残っているものだけを増幅すれば、存在量の差を補正できる。本発明では、一本鎖のままで残っているものだけを増幅するために、制限酵素による分解を採用したことに主たる特徴がある。以下、工程毎に説明する。

（a）の工程では、試料中のDNA断片の両端に、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプターが付加されて、試料中のDNA断片に存在しない制限酵素認識部位が形成され、かつ、少なくとも両端の制限酵素認識部位の間が制限酵素認識部位も含めて二本鎖とされたDNA断片を準備する。

アダプターの塩基配列は、DNA断片の塩基配列を考慮して、（4）の工程で使用される制限酵素によりアダプター内でのみ切断されるようなものとする。これにより、（d）の工程で使用される制限酵素はアダプター内にのみ切断部位を有するものとなる。アダプターの長さは、通常には20～30塩基である。

制限酵素認識部位が形成されるとは、アダプターが付加されたDNA断片が制限酵素認識部位を有することを意味し、アダプター内に制限酵素認識部位が存在すること、及び、アダプターとDNA断片との連結により制限酵素認識部位が形成されることの両方を包含する。試料中のDNA断片が両端に共通の塩基配列を有している場合には、アダプターとDNA断片との連結により制限酵素認識部位が形成されるような、アダプターの塩基配列を設計することは容易である。

二本鎖とされる部分は、少なくとも、制限酵素認識部位も含む両端の制限酵素認識部位の間であり、全長であってもよい。

DNA断片が一本鎖の場合には、遺伝子工学の分野で通常の手段により、二本鎖とする。アダプターの付加は、二本鎖とする前でも後でもよい。すなわち、一本鎖のDNA断片とアダプターを連結し、次いで必要な部分を二本鎖としてもよいし、DNA断片とアダプターをそれぞれ二本鎖として、次いでそれらを連結し

てもよいし、DNA断片を二本鎖とし、一方の鎖にアダプターを連結し、次いで一本鎖部分をフィルインして必要な部分を二本鎖としてもよい。DNA断片が二本鎖の場合には、アダプター付加の方法としては、上記の後者の2つの方法が挙げられる。連結は、遺伝子工学の分野で通常の方法により行うことができる。

また、DNA断片がアダプターに相当する塩基配列を両端に有している二本鎖である場合には、そのまま用いればよい

(b)の工程では、(a)の工程で準備された二本鎖DNA断片を変性させる。

変性は、遺伝子工学の分野で通常の方法により行うことができる。例えば、加熱による変性が挙げられ、この場合条件としては、二本鎖DNA断片の塩基配列によって異なるが、例えば94～100℃で3～5分の条件が挙げられる。

(c)の工程では、(b)の工程で変性したDNA断片を、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせる。

変性したDNA断片のハイブリダイゼーションは、アニーリングとも呼ばれるものであり、遺伝子工学の分野で通常の方法により行うことができる。この過程では、存在量の多いDNA断片は早くハイブリダイズし、存在量の少ないDNA断片は遅くハイブリダイズする。この結果、一本鎖のままで残るDNA断片の存在量の差は小さくなっていく。従って、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせることにより、各DNA断片の一本鎖の量は均一化される。このことから理解されるように、本発明において「均一化」とは、DNA断片の量の差を小さくすることを包含する。

一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件とは、完全に二本鎖が形成される前に、次の工程の処理を開始できるものであればよい。例えば、温度を下げることによりハイブリダイゼーションを開始し、完全に二本鎖が形成される前にハイブリダイゼーションを終了させればよい。この場合の具体的な条件としては、DNA断片の塩基配列によって異なるが、例えば65～70℃で12～20時間の条件が挙げられる。一部のDNA断片が一本鎖のままで残っているか否かは、ゲル電気泳動によって確認でき、当業者であれば適切な条件を選択することは容易

である。DNA断片濃度やハイブリダイズさせる時間を調節することで、ある程度多いものだけを減らしたり、反対に非常に量の少ないものを増加させることも可能になると考えられる。

(d)の工程では、(c)の工程でハイブリダイズした二本鎖DNA断片をアダプター内にのみ切断部位を有する制限酵素により切断する。

制限酵素は、アダプター及び試料中のDNA断片の配列に基づいて適宜選択される。アダプター内には、アダプターとDNA断片の連結部位も包含される。

切断の条件としては、制限酵素によって異なるが、例えば、30～37℃、pH 7.5～8.5で30～120分の条件が挙げられる。

(e)の工程では、(d)の工程で得られたDNA断片を鋳型とし、切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う。

PCRは通常の方法によって行うことができる。当業者であれば、鋳型及びプライマーの塩基配列を考慮して適切な条件を設定することは容易である。プライマーの長さは、通常には、20～30塩基である。アダプターとして用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとしてもよい。

本発明は、本発明の均一化方法に使用するためのキットも提供する。このキットは、試料中のDNA断片の両端に付加するための、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプター、アダプター内に切断部位を有する制限酵素、および、その制限酵素による切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するPCR用プライマーを含む。

アダプター、制限酵素及びPCR用プライマーは、上記の本発明の均一化方法に関して説明した通りである。

本発明のキットは、アダプター、制限酵素及びPCR用プライマーの他に、制限酵素による切断に必要な試薬類（緩衝液など）やPCRに必要な試薬類（緩衝液、dNTP、DNAポリメラーゼ等）の一部または全部を含んでもよい。

サブトラクティブハイブリダイゼーションは、異なる2種の細胞から調製され

たmRNAまたはcDNAをハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしなかったcDNAを分離することにより、特異的な（すなわち、細胞間で発現量の異なる）cDNAを検出するものである。この方法の効率を左右する重要な点はハイブリダイゼーションの効率である。発現量の少ないものは、発現量の多いものに比べてハイブリダイゼーションの効率が低いため、発現量の少ない遺伝子を単離することは難しい。従って、本発明の均一化方法をサブトラクティブハイブリダイゼーションと組み合わせることにより、試料中のDNA断片の量を均一化することにより、発現量の低い遺伝子においても、細胞間の遺伝子発現の差異を検出することが可能になる。

従って、本発明は、サブトラクティブハイブリダイゼーションを1回以上行うことを含む、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法（以下、「検出方法」ともいう）であって、少なくとも1回のサブトラクションハイブリダイゼーションの前または後に本発明の均一化方法により均一化を行うことを含む方法も提供する。

本発明の検出方法は、少なくとも1回のサブトラクションハイブリダイゼーションの前または後に本発明の均一化方法により均一化を行うこと以外は、通常サブトラクティブハイブリダイゼーションを1回以上行うことを含む、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法と同様でよい。

少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションが、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片を生じるものである場合には、本発明の均一化方法の上記（a）の工程が簡略化できるので、そのサブトラクションハイブリダイゼーションの後に均一化を行うことが好ましい。

サブトラクティブハイブリダイゼーションを2回以上行うことによって、発現量の差が小さい場合でも、検出可能になることが知られている。このようなサブトラクティブハイブリダイゼーションを2回以上行う方法としてはレプレゼンテーションディファレンスアナリシス（RDA）法が知られている。

RDA法では、以下のようなサブトラクティブハイブリダイゼーションが複数回行われる。アダプターと呼ばれるオリゴヌクレオチドを付加したcDNA断片（テスト

一) と、アダプターを付加していないcDNA断片(ドライバー)とを、変性させた後にハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイズした二本鎖のうち、アダプターの部分が一本鎖になっているものの相補鎖を合成して全長を二本鎖とした後、アダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行う。アダプターを付加していないcDNA断片をドライバーとして大過剰に加えることにより、テスター特異的なものだけが両端にアダプターを持つ二本鎖を形成し、このようなcDNA断片だけがPCRで増幅されることになる。例えばテスターに対して100倍量のドライバーを用いた場合、非特異的なものは、100分の1に減少することになり、したがって特異的なものは100倍濃縮されることになる。しかし、テスターとドライバーにおける存在量の差が非常に少ない場合、100倍程度の濃縮では特異的な遺伝子を単離することは困難である。そこで、2回以上(通常には3~4回)のサブトラクション操作を繰り返して、非特異的なものを完全に除去することで、より差の少ない細胞間で特異的に発現する遺伝子を単離することが可能になっている。

しかしながら、発現量の少ないものは、発現量の多いものに比べてハイブリダイゼーションの効率が低いため、サブトラクティブハイブリダイゼーションを繰り返すに従い、量の差がさらに開いていくことになると考えられる。通常のRDA法では、例えば、1回目で100倍量、2回目で800倍、3回目で400000倍とドライバーの比率をかなり上げている。これはバックグラウンドを下げるために有効であると考えられる。しかし、ドライバーに用いることのできるcDNA量には限界があり、実際にはテスターの量を減らすことで、比率を高くしている。このために、発現量の少ないものの二本鎖形成頻度はますます下がっていくことになり、量の多いものばかりが優先されて増幅されることになる。

従って、RDA法のような、サブトラクティブハイブリダイゼーションが2回以上行われる方法において、少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションの前または後に本発明の均一化方法により均一化を行うことが好ましい。また、RDA法におけるサブトラクティブハイブリダイゼーションでは、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片が生じるので、RDA法におけるアダプターが本

発明の均一化方法におけるアダプターとして使用できるものであれば、ハイブリダイゼーションの後に行うことが好ましい。

サブトラクティブハイブリダイゼーションと均一化は、1回目のサブトラクションの後に、均一化を行い、それから2回目以降のサブトラクションを行うことが好ましい。特に、ある程度多いものだけを減らすような条件で均一化を行うことで、比較的少ないものも単離しやすくなると考えられる。

本発明の均一化方法と組み合わせたRDA法においては、上述のように、サブトラクションを行うにしたがって存在量の差が開くのを押えるために、テスター:ドライバの比率を下げて、テスター濃度を上げるようにすることが好ましい。例えば、サブトラクティブハイブリダイゼーションの1回目で30～50倍、2回目で100～300倍、3回目で1000～5000倍のドライバを用いる条件が挙げられる。発現量の差を補正するための均一化のステップは1回目と2回目のサブトラクティブハイブリダイゼーションの間に入れることが好ましい。

RDA法では、最初にクローニングした特異的なcDNA断片をドライバに加えることで、さらに他の種類のcDNA断片を増幅でき、効率よく多くの種類の遺伝子を単離できる。

遺伝子の発現量の差をある程度均一化しながらサブトラクションを行う方法としては、サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション (SSH) 法が知られている。しかしながら、SSH法では、サブトラクションハイブリダイゼーションは一度行うだけなので、バックグラウンドを十分に除くことは不可能で、発現量の程度によっては特異的なcDNAがバンドとして見えるほどの濃縮は期待できないことがある。本発明の均一化方法と組み合わせたRDA法では、複数回のサブトラクティブハイブリダイゼーションが行われるので、一層発現量の少ない遺伝子でも単離できると考えられる。

本発明の検出方法により遺伝子発現の差異を検出する細胞は、特に限定されず、異なる組織に由来する細胞間、同じ細胞であっても異なる条件下で培養された細胞間での遺伝子発現の差異の検出に本発明の検出方法を適用することができる。

さらに、本発明は、本発明の検出方法により発現の差異が検出された遺伝子をクローニングすることを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子のライブラリーを製造する方法、及び、本発明の検出方法により発現の差異が検出された遺伝子の断片を調製することを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子に特異的なプローブを製造する方法を提供する。

遺伝子のクローニングによるライブラリーの製造及び遺伝子の断片の調製によりプローブの製造は、遺伝子が本発明の検出方法により発現の差異が検出された遺伝子であることの他は、通常の方法により行うことができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1

[プロトコール]

(1) アダプターの調製

配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad2S及びad2A)をアニーリングさせてアダプターを調製する。アニーリングは以下の条件で行う。TEは、1 mM EDTAを含む10 mM Tris/HCl (pH 8.0)緩衝液を示す。

反応液組成

0.2 M NaCl	2 μ l
500 μ M ad2S (in TE)	9 μ l
500 μ M ad2A (in TE)	9 μ l

反応の温度及び時間

94°C 5分→50°C 5分→47°C 5分→44°C 5分→41°C 5分→38°C 5分→35°C 5分→32°C 5分→29°C 5分→4°C

アニール後、30 μ l TEを加えて、100 μ Mのアダプター (ad2) 溶液とする。

同様に、配列番号 3 及び 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad3S及びad3A)、配列番号 5 及び 6 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad4S及びad4A)、配列番号 7 及び 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad5S及びad5A)、配列番号 9 及び 10 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad13S及びad13A)、ならびに配列番号 11 及び 12 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ad14S及びad14A)を用いて、アダプター（それぞれ、ad3、ad4、ad5、ad13及びad14）溶液を調製する。

(2) cDNA合成

試料から、TAKARA cDNA synthesis kitを用いて二本鎖cDNAを合成する。得られたcDNAを、QIAquick PCR purification kit（以下、キアクイックという）を用いて精製する（20 μ l TEで溶出）。精製されたcDNAを100 μ l系でRsaI消化（TAKARA AfaI）し、キアクイックを用いて精製する。1 μ g poly(A)+RNA使用の場合、20 μ l TEで溶出する。1 μ g 全RNA使用の場合は、50 μ l TEで溶出し、エタノール沈殿後、2 μ l TEに溶解する。

(3) cDNAとアダプターad2の結合

TAKARA DNA ligation kit Ver2を用いてcDNAとアダプターad2を結合させる。cDNA 1 μ l、100 μ M ad2 1 μ l、II液 2 μ l及びI液 4 μ lを混合し、16°Cで2時間反応させ、アダプターad2が付加されたcDNAの溶液（ad2 lig cDNA）を得る。

(4) アダプターad2が付加されたcDNAの増幅

以下の条件でPCRを行う。

反応液組成

10 \times ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M ad2S	0.5 μ l
ad2 lig cDNA	1 μ l又は0.1 μ l
DW	39.25 μ l

反応の温度及び時間

72°C 5分→(94°C 30秒→65°C 30秒→72°C 2分)×15サイクル→72°C 2分

反応液の10 μ lを泳動してみて、鋳型が1 μ lのときにで増えきっていて(約500 ng/ μ l)、0.1 μ lのときでもそれなりの量が見えていれば、10⁷以上の種類が含まれていると考えられる。

鋳型が1 μ lの方の残り40 μ lをキアクイックを用いて精製し(40 μ l TEで溶出)、増幅されたcDNAの溶液(cDNA ad2 amp)を得る。

(5) テスターおよびドライバーの作製

cDNA ad2 ampに含まれるcDNAは一本鎖になっているものが多いので、以下の条件で再びPCRを行う。

反応液組成

10×ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M ad2S	0.5 μ l
cDNA ad2 amp	0.5 μ l
DW	39.75 μ l

反応の温度及び時間

94°C 2分→(94°C 30秒→65°C 30秒→72°C 2分)×5サイクル→72°C 2分

テスター用には1本、ドライバー用にはサブトラクション1サイクルにつき5本、計20本PCRを行い、反応液の10 μ lを泳動してチェックした後(約100ng/10 μ l)、残りをキアクイック(テスター1本、ドライバー4本のカラムで)を用いて精製し(20 μ l TEで溶出)、増幅されたcDNAの溶液(cDNA ad2 amp (5cycles))を得る。これを、以下の条件でRsaI消化する。

反応液組成

cDNA ad2 amp (5cycles)	20 μ l
10 \times T	10 μ l
BSA	10 μ l
RsaI(10u/ μ l)	2 μ l
DW	58 μ l

(テスター 1 本、ドライバー 4 本)

ドライバー用は37°Cで2時間反応後、70°Cで5分の処理で制限酵素を失活させて完成ドライバー溶液(cDNA ad2 amp RsaI)を得る。

テスター用は37°Cで1時間反応後、キアクイックで精製し(20 μ l TEで溶出)、消化産物(cDNA ad2 amp RsaI)を得る。

TAKARA DNA ligation kit Ver2を用いて消化産物とアダプターad3を結合させる。cDNA ad2 amp RsaI 3 μ l、100 μ M ad3 1 μ l、II液 4 μ l及びI液 8 μ lを混合し、16°Cで1時間反応させ、70°Cで5分の処理で制限酵素を失活させ、完成テスター溶液(cDNA ad3 lig)を得る。

(6) サブトラクション 1 回目

テスター溶液(cDNA ad3 lig)16 μ l及びドライバー溶液(cDNA ad2 amp RsaI)100 μ lを混ぜて(T:D=1:40)、キアクイックを用いて精製し(50 μ l TEで溶出)、エタノール沈殿させる。

cDNA(テスター&ドライバー混合物) 50 μ l、3M 酢酸ナトリウム 5 μ l、10mg/ml グリコーゲン 1 μ l及びエタノール 125 μ lを混ぜてすぐに5分間遠心する。70%エタノールでリンスして乾燥後、1 \times PCRバッファー 1 μ lに溶かし、PCRチューブに移して、ミネラルオイルを重層する。98°C5分間ののち、1 \times PCRバッファー+1M NaCl 1 μ lを加えて混ぜ、98°C5分→68°C16時間の処理を行う。

TE10 μ lを加えて新しいチューブに回収し、以下の条件でPCRを行う。

反応液組成

10×Taq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
Taq	0.5 μ l
100 μ M ad3S	0.5 μ l
処理試料	2 μ l
DW	38 μ l

反応の温度及び時間

72°C 5分→(94°C 30秒→65°C 30秒→72°C 2分)×10サイクル→4°C

5本分を1本のカラムでキアクイックを用いて精製し、エタノールで沈殿させる。70%エタノールでリンスし、乾燥してからTE 5 μ l、10×ムングビーンバッファー 5 μ l、DW 38.5 μ l、及び、ムングビーンヌクレアーゼ 1.5 μ lを加えて室温で20分静置する。

0.05M EDTA 5 μ l、及び、50mM Tris7.6/100mM NaCl 45 μ lを加えてから、キアクイックで精製し(30 μ lTEで溶出)、精製物(S1 pure)を得る。

以下の条件でPCRを行う。

反応液組成

10×Taq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
Taq	0.25 μ l
100 μ M ad3S	0.5 μ l
S1 pure	2 μ l
DW	38.25 μ l

反応の温度及び時間

94°C 2分→(94°C 30秒→65°C 30秒→72°C 2分)×12サイクル→72°C 2分

反応液の10 μ lを泳動してみて、完全に増幅していることを確認する。反応液の残りをキアクイックを用いて精製し（40 μ l TEで溶出）、増幅産物（S1 amp）を得る。バンドのパターンを確認したい場合は2回目のPCRを、5, 7サイクルの条件でも行い、泳動してみる。

（7）均一化（ノーマライゼーション）

S1 ampをTEで5倍希釈したもの1 μ lに、2 \times PCRバッファ1 μ lを加えて、ミネラルオイルを重層して98 $^{\circ}$ C5分間ののち、1 \times PCRバッファ+1M NaCl 2 μ lを加えて混ぜ、98 $^{\circ}$ C5分 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C16時間の処理を行う。

10 \times T buffer 10 μ l、BSA 10 μ l、RsaI 3 μ l、及び、DW 73 μ lを加えて、37 $^{\circ}$ C 1時間の処理ののち、キアクイックを用いて精製し（20 μ l TEで溶出）、精製物（N1 pure）を得る。

以下の条件でPCRを行う

反応液組成

10 \times ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M ad3S	0.5 μ l
N1 pure	2 μ l
DW	38.25 μ l

反応の温度及び時間

94 $^{\circ}$ C 2分 \rightarrow （94 $^{\circ}$ C 30秒 \rightarrow 65 $^{\circ}$ C 30秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2分） \times 11~15サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2分

反応液の10 μ lを泳動してみて、約50ng（薄く見えるぐらい）になっているサイクル数のサンプルの残りをキアクイックを用いて精製し（20 μ l TEで溶出）、RsaIで消化する（37 $^{\circ}$ C 1時間）。これをキアクイックを用いて精製し（20 μ l TEで

溶出)、消化産物(N1 amp RsaI)を得る。

TAKARA DNA ligation kit Ver2を用いて消化産物とアダプターad4を結合させる。N1 amp RsaI 2 μ l、100 μ M ad4 1 μ l、II液 3 μ l及びI液 6 μ lを混合し、16°Cで1時間反応させ、70°Cで5分の処理で制限酵素を失活させ、2回目用テスター溶液(N1 amp ad4 lig)を得る。

(8) サブトラクション2回目

テスター溶液(N1 amp ad4 lig) 12 μ l及びドライバース溶液(cDNA ad2 amp RsaI) 100 μ lを混ぜて(T:D=1:100)、キアクイックを用いて精製し(50 μ l TEで溶出)、エタノールで沈殿させる。

以降、1回目のサブトラクションと同様に行う(ムングビーンヌクレアーゼ処理後のPCRは3~7サイクル)。

反応液の10 μ lを泳動してみて、約50ng(薄く見えるぐらい)になっているサイクル数のサンプルの残りをキアクイックを用いて精製し(20 μ l TEで溶出)、RsaIで消化する(37°C 1時間)。これをキアクイックを用いて精製し(20 μ l TEで溶出)、消化産物(NS2 amp RsaI)を得る。

TAKARA DNA ligation kit Ver2を用いて消化産物とアダプターad5を結合させる。NS2 amp RsaI 1/5希釈1 μ l、100 μ M ad5 1 μ l、II液 2 μ l及びI液 4 μ lを混合し、16°Cで1時間反応させ、70°Cで5分の処理で制限酵素を失活させ、3回目用テスター溶液(NS2 amp ad5 lig)を得る。

(9) サブトラクション3回目

テスター溶液(NS2 amp ad5 lig) 8 μ l及びドライバース溶液(cDNA ad2 amp RsaI) 100 μ lを混ぜて(T:D=1:1000)、キアクイックを用いて精製し(50 μ l TEで溶出)、エタノールで沈殿させる。

以降、1回目のサブトラクションと同様に行う(ムングビーンヌクレアーゼ処理後のPCRは6、8、12サイクルで行う)。

このときに、増幅された種類が少なければ、二本鎖で終了していると考えられるので、そのまま、TAベクターなどにクローニングする。もし、種類が多い場合

には、100倍に希釈して、5サイクルのPCRを行い、二本鎖にしてからクローニングする。

実施例 2

[実験系の精度検証 1 (モデル系)]

実施例 1 に記載の方法により、どの程度の発現量および発現量の差まで遺伝子が単離可能なのか調べるために、血管内皮細胞株MS1より調製したcDNAにバクテリオファージφX174由来DNA RsaI消化断片を加えたものをテスターおよびドライバーに用いて、φX174断片が単離できるかどうか検討した。

図 2 の A に、テスターとしてMS1 cDNAに6種類のφX174 RsaI断片をいずれも $1/10^5$ の割合で加えたものを、ドライバーとしてMS1 cDNAを用いて、実施例 1 に記載の方法(N-RDA法)および均一化の工程を省略した方法(RDA法)を行った場合の最終的なPCR産物の電気泳動を示す。レーン1は加えた6種類のφX174 RsaI断片 (F1～F6)、レーン 2 はRDA法の 3 回目のサブトラクション後の増幅産物、レーン 3 はN-RDA法の 3 回目のサブトラクション後の増幅産物の泳動の結果を示す。いずれの方法も6種類のうち5種類が増幅されており、 $1/10^5$ の割合で存在する特異的な断片のほとんどを単離できることが明らかになった。

図 2 の B では A と同様に $1/10^6$ の割合でφX174 RsaI断片を加えた場合の結果を示す。この割合ではいずれの方法でもφX174 RsaI断片は増幅されなかった。したがって、これらの方法の限界が $1/10^5$ から $1/10^6$ の間であることが明らかになった。

図 3 の A では、6 種類のφX174 RsaI断片を、図に示した割合で加えた場合の結果 (3 回目のサブトラクション後の増幅産物の泳動の結果) を示す。RDA法では、 $1/10^4$ の割合で加えたF1とF4が効率良く増幅され、 $1/10^5$ の割合で加えたF2の増幅も見られた。一方、N-RDA法では、RDA法に比べてF2の量が増加しており、さらにF5の増幅も見られたことから、均一化の効果が出ていることが確認された。

次に、10倍の発現の差でも単離できるかどうか検討するために、ドライバーにも同じφX174 RsaI断片をテスターの10分の1の割合で加えて実験を行った (図 3

のB)。RDA法では、テスターに $1/10^4$ の割合で含まれているもの (F1、F3、F5) に関しては10倍の差でも増幅されてくることが確認できたが、 $1/10^5$ で存在するものは増幅されなかった。これに対して、N-RDA法では、 $1/10^5$ で含まれるF2、F4も増幅された。

さらに、最も現実に近いモデルとして、存在量およびテスターとドライバー間の存在量比の異なる ϕ X174 RsaI断片を加えた場合について検討した (図3のC)。その結果、RDA法では特異的で量の多いF3が優先されて増幅し、かろうじてF1、F4、F5の増幅が確認できた。これに対してN-RDA法ではF1、F4、F5の量が増加し、さらにF2の増幅が見られた。

以上の結果から、いずれの条件でも均一化の効果が確認され、なるべく多くの遺伝子を一度に単離するためにはN-RDA法が非常に有効であることが明らかである。

実施例 3

[実験系の精度検証 2 (ヒト正常各種組織由来血管内皮細胞間のサブトラクション)]

いくつかのヒト正常組織由来血管内皮細胞間でのサブトラクションを行った。材料として、さい帯静脈内皮 (VE)、さい帯動脈内皮 (AE)、皮膚毛細血管内皮 (ADM)、扁桃内皮 (TE)、及び、脳毛細血管内皮 (BME) を用いた。また、比較的差の大きい細胞間の比較として、マウス血管内皮細胞株MS1とマウス上皮細胞株Eph4の間でサブトラクションを行った。

サブトラクションを行った組み合わせを図4に示す。血管内皮細胞間のサブトラクションでは数本から数十本のバンドが増幅された。これに比べてMS1/Eph4のサブトラクションでは非常に多くのバンドが増幅された。この結果は、発現の特異的な遺伝子の種類数を反映していると考えられる。

次に、増幅された遺伝子が実際に特異的な発現を示すのかどうか確認するために、血管内皮細胞間のサブトラクションで増幅されたバンドをクローニングし、各血管内皮細胞より調製したcDNAに対してサザンブロットを行った (図5)。そ

の結果、12種類のうち11種は完全に特異的あるいは10倍以上の発現の差があることが認められ、残りの1種についても数倍の差があることが明らかになった。以上の結果から、N-RDA法は、実際に比較的差の少ない細胞間でも低いバックグラウンドで発現の特異的な遺伝子を単離できる方法であることが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明の方法によれば、試料中のDNA断片量を均一化することができる。この均一化方法をサブトラクションハイブリダイゼーションと組み合わせることにより、発現量の少ない遺伝子であっても、発現量の相違に基づいて遺伝子を単離することが可能になる。

請求の範囲

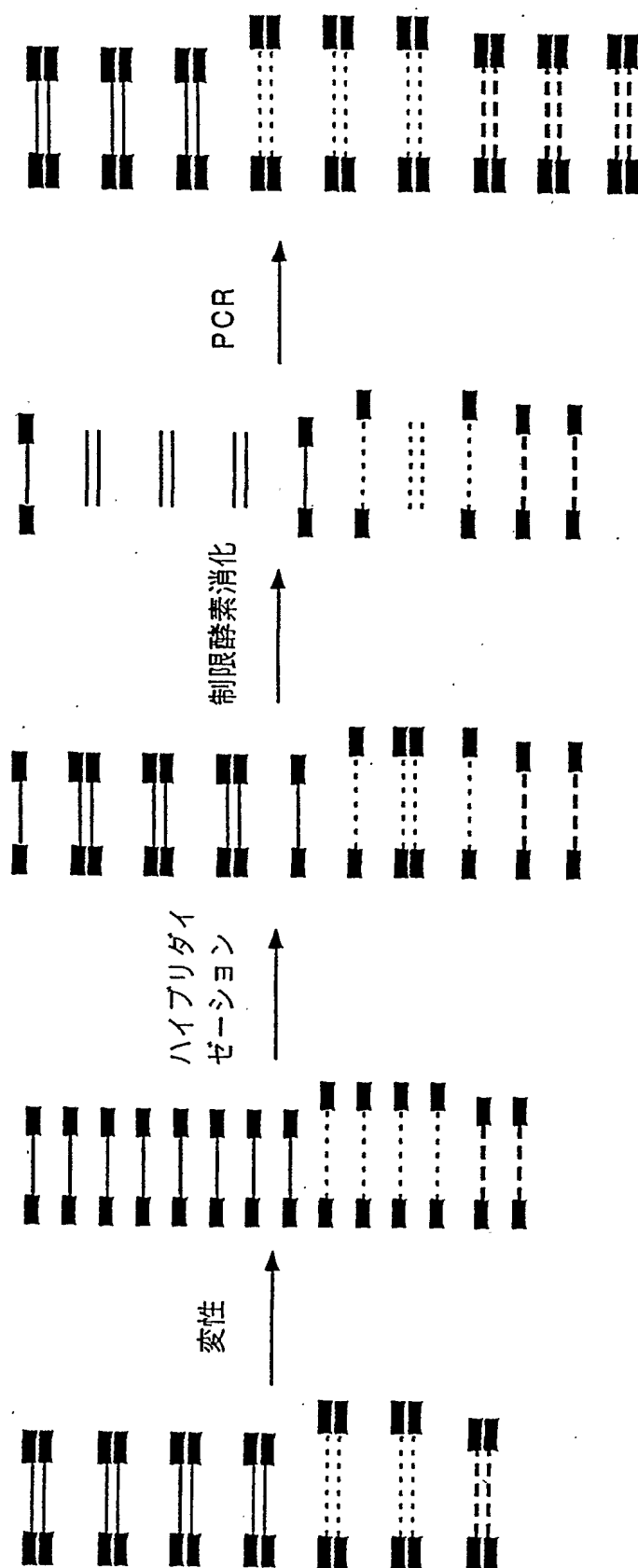
1. 試料中のDNA断片の量を各DNA断片間で均一化する方法であって、
試料中のDNA断片の両端に、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプターが付加されて、試料中のDNA断片に存在しない制限酵素認識部位が形成され、かつ、少なくとも両端の制限酵素認識部位の間が制限酵素認識部位も含めて二本鎖とされたDNA断片を準備し、
準備された二本鎖DNA断片を変性させ、
変性したDNA断片を、一部のDNA断片が一本鎖のままで残る条件でハイブリダイズさせ、
ハイブリダイズした二本鎖DNA断片を、アダプター内にのみ切断部位を有する制限酵素により切断し、
得られたDNA断片を鋳型とし、切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う
ことを含む方法。
2. サブトラクティブハイブリダイゼーションを1回以上行うことを含む、細胞間の遺伝子発現の差異を検出する方法であって、少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションの前または後に請求項1記載の方法により均一化を行うことを含む方法。
3. 少なくとも1回のサブトラクティブハイブリダイゼーションが、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片を生じるものであり、そのサブトラクティブハイブリダイゼーションの後に均一化を行う請求項2記載の方法。
4. サブトラクティブハイブリダイゼーションが2回以上行われ、1回目のサブトラクティブハイブリダイゼーションが、両端にアダプターが付加された二本鎖DNA断片を生じるサブトラクティブハイブリダイゼーションである請求項3記載の方法。
5. 請求項2～4のいずれか1項に記載の方法により発現の差異が検出された遺伝子をクローニングすることを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子のライブ

ラリーを製造する方法。

6. 請求項 2～4 のいずれか 1 項に記載の方法により発現の差異が検出された遺伝子の断片を調製することを含む、細胞間で発現が相違する遺伝子に特異的なプローブを製造する方法。

7. 試料中の DNA 断片の両端に付加するための、オリゴデオキシリボヌクレオチドからなるアダプター、アダプター内に切断部位を有する制限酵素、および、その制限酵素による切断前のアダプターの塩基配列に相補的な塩基配列を有する PCR 用プライマーを含む、請求項 1 記載の方法に使用するためのキット。

1/5



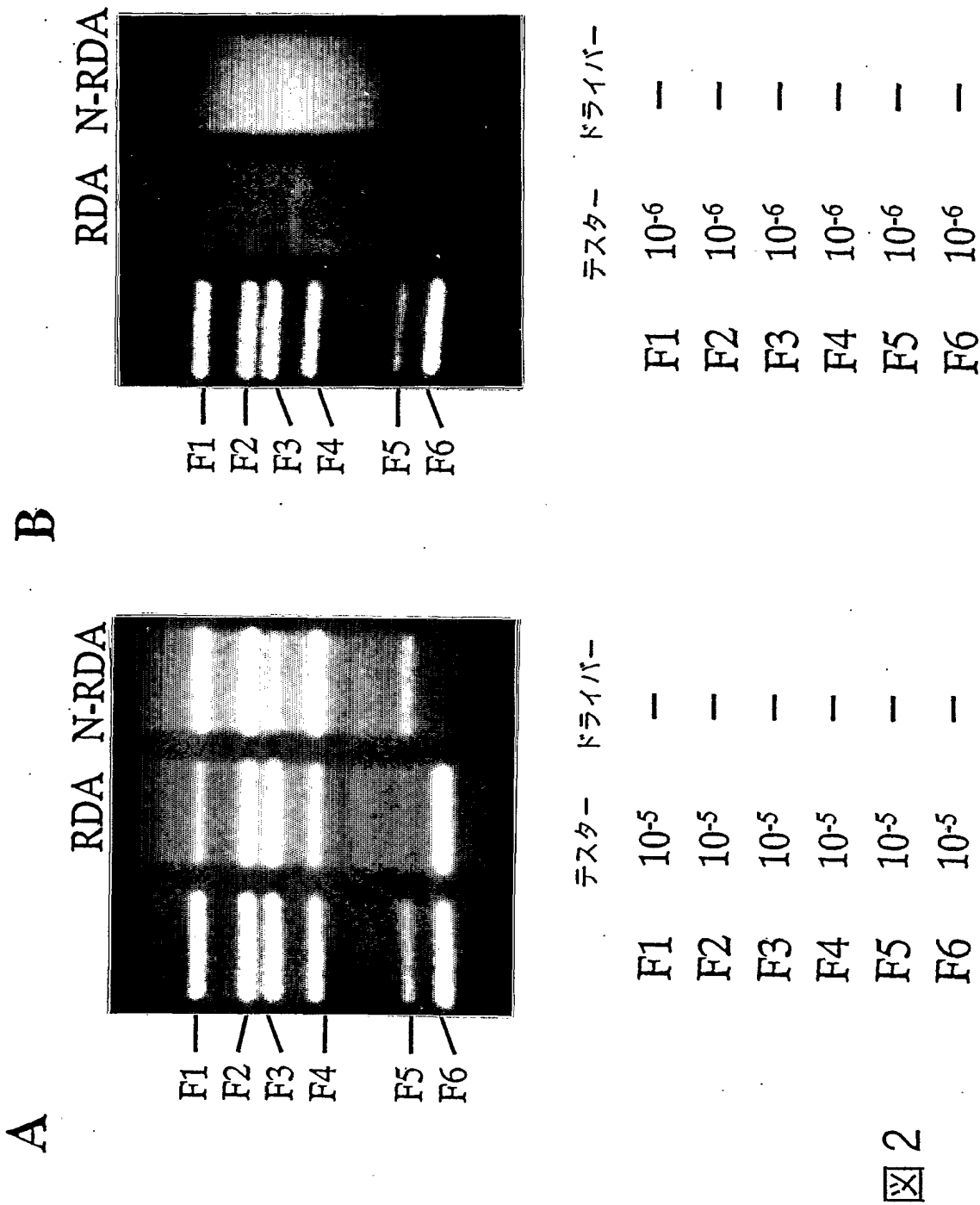
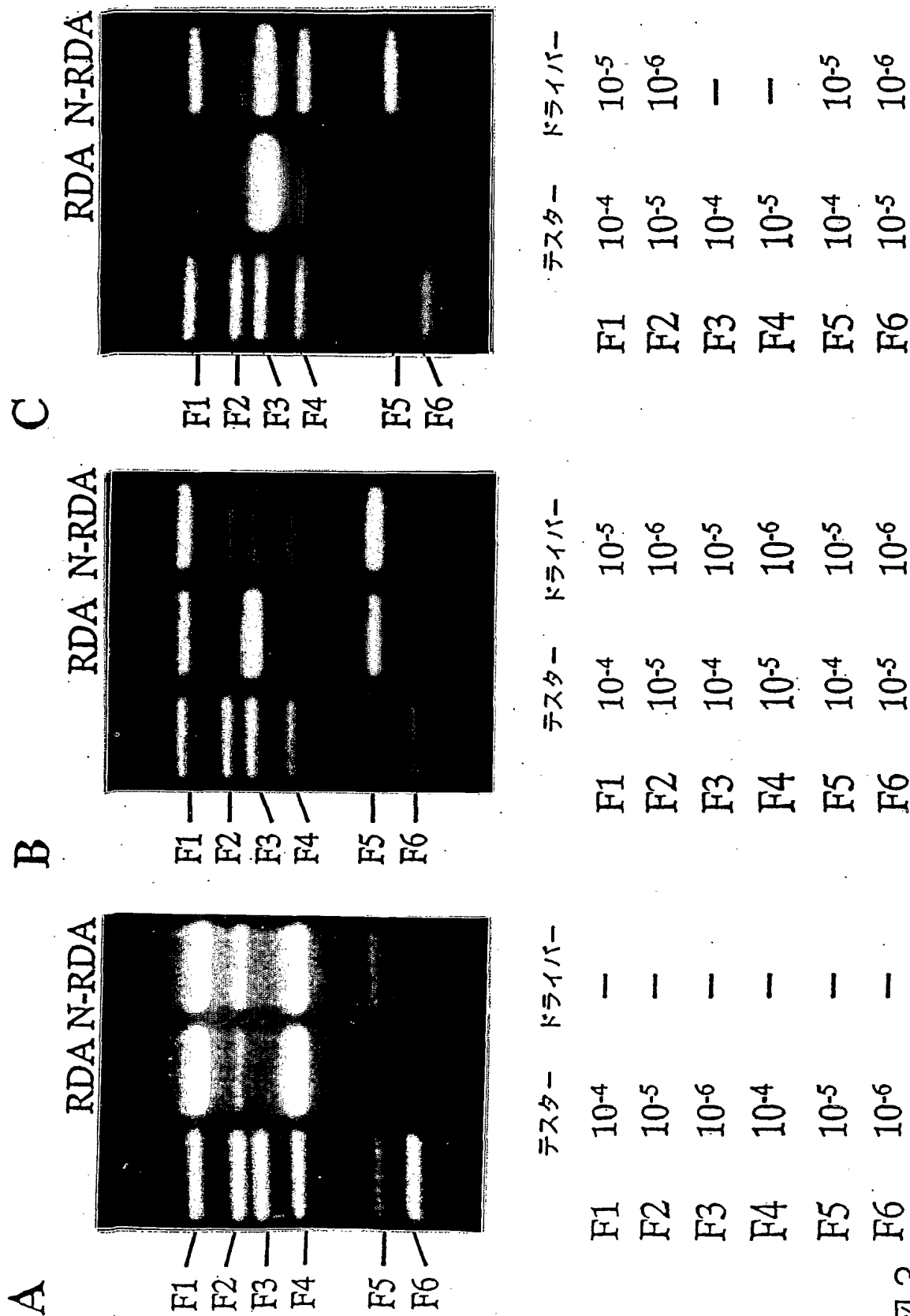


図 2

3/5



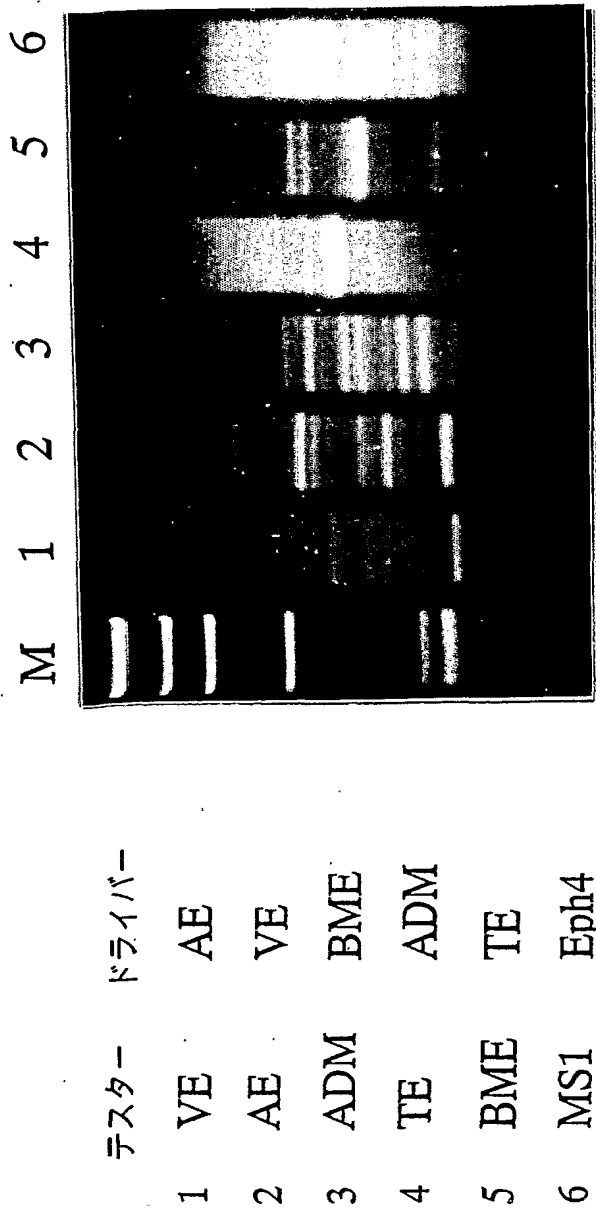
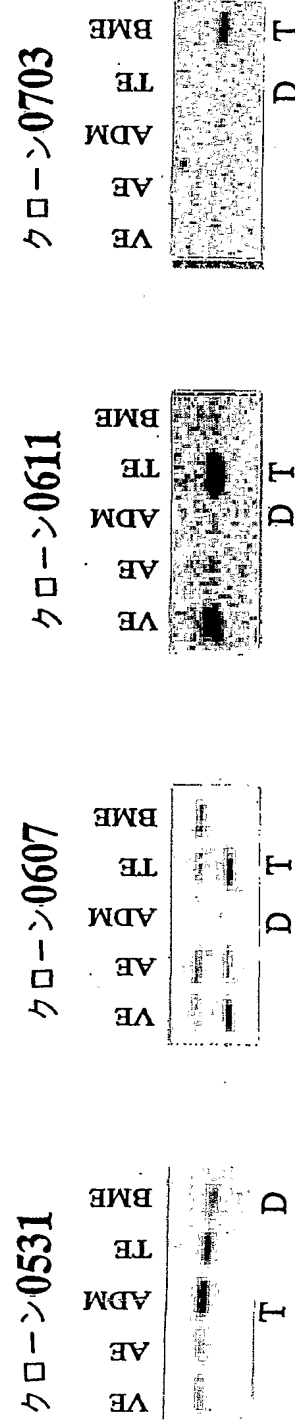
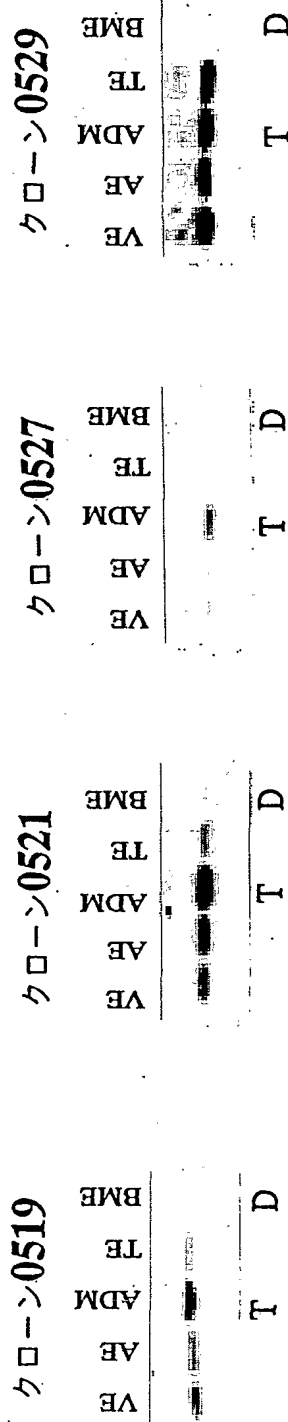
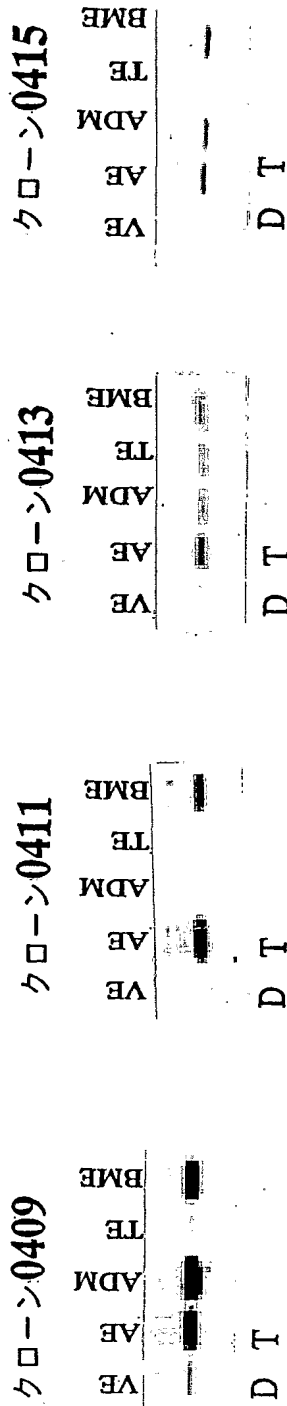


図 4



1/4

SEQUENCE LISTING

<110> エーザイ株式会社(Eisai Co., Ltd.)

<120> DNA断片の量の均一化方法及びサブトラクション法

<130> OP1333-PCT

<150> JP 2001-184757

<151> 2001-06-19

<160> 12

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

acggaatgat gt

12

<210> 3

<211> 26

2/4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 3

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 4

accagagtct ca

12

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 5

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3/4

<223> synthetic DNA

<400> 6

acacactcac ag

12

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 7

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 8

actgtcacac tg

12

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 9

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

4/4

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 10

acgatcgaca gt

12

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 11

agtgctacgt acacatgtct ggctgt

26

<210> 12

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

acagccagac at

12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-325080 A (Rikagaku Kenkyusho), 28 November, 2000 (28.11.00), (Family: none)	1-7
A	EP 870842 A2 (Japan Sci. & Technology Corp.), 14 October, 1998 (14.10.98), & JP 10-337200 A & JP 2-905192 B2 & US 6090556 A	1-7
A	JP 6-153952 A (Nobuaki TAMAKI), 03 June, 1994 (03.06.94), (Family: none)	1-7
A	JP 9-234074 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 09 September, 1997 (09.09.97), (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
26 August, 2002 (26.08.02)

Date of mailing of the international search report
10 September, 2002 (10.09.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06109

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-23885 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 28 January, 1997 (28.01.97), (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-325080 A (理化学研究所) 2000.11.28 (ファミリーなし)	1-7
A	EP 870842 A2 (JAPAN SCI & TECHNOLOGY CORP) 1998.10.14 & JP 10-337200 A & JP 2-905192 B2 & US 6090556 A	1-7
A	JP 6-153952 A (玉巻 伸章) 1994.06.03 (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.08.02

国際調査報告の発送日

10.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-234074 A (住友電気工業株式会社) 1997. 09. 09 (ファミリーなし)	1 - 7
A	JP 9-23885 A (第一製薬株式会社) 1997. 01. 28 (ファミリーなし)	1 - 7